

METHOD AND COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF MAMMALIAN HIV INFECTION

Patent Number: WO9108753

Publication date: 1991-06-27

Inventor(s): VOLKER ERFLE (DE); SAERMARK TORBEN (SE)

Applicant(s): STRAHLEN UMWELTFORSCH GMBH (DE)

Requested Patent: JP7005475B

Application Number: WO1990EP02127 19901207

Priority Number (s): DE19893940526 19891207

IPC Classification: A61K37/02

EC Classification: A61K38/17, C07K14/16D, C07K14/435A4

Equivalents: AU646652, AU6880891, BR9007904, DK504191T, EP0504191 (WO9108753), A1, B1, ES2048137T, GR93300031T, KR9705329

Cited patent(s): US3856936

Abstract

A method and composition are described for the treatment of mammalian HIV infections including administering an effective subtoxic dosage of melitin to the mammal whereby the growth of HIV infected cells or the replications of the virus in the infected cells of the mammal is inhibited.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑫ 公表特許公報 (A)

平5-504761

⑬ 公表 平成5年(1993)7月22日

⑭ Int. Cl.⁹
A 61 K 37/02識別記号
ADY庁内整理番号
8314-4C審査請求有
予備審査請求有

部門(区分) 3(2)

(全23頁)

⑮ 発明の名称 哺乳類のHIV感染症の治療のための方法及び組成物

⑯ 特願 平3-500651
⑰ 出願 平2(1990)12月7日⑮ 翻訳文提出日 平4(1992)6月5日
⑯ 国際出願 PCT/EP90/02127⑰ 國際公開番号 WO91/08753
⑯ 國際公開日 平3(1991)6月27日

優先権主張 ⑮ 1989年12月7日 ⑯ ドイツ(DE) ⑰ P3940526.5

⑮ 発明者 フォルカー、エルフル

ドイツ連邦共和国, デー-8000 ミュンヘン
80, コルベルガー シュトラーセ 7
ドイツ連邦共和国, デー-8042 ノイヘルベルク, インゴルシュタットター ラントシュ
トラーーゼ 1⑮ 出願人 ゲーエスエーフォルシュンクスツエントルム フュ
ア ウムベルト ウント ゲズントハイト ゲゼルシ
ヤフト ミット ベシュレンクテル ハフツング

⑮ 代理人 弁理人 青木 朗 外3名

⑮ 指定国 A T(広域特許), A U, B B, B E(広域特許), B F(広域特許), B G, B J(広域特許), B R, C F(広域特
許), C G(広域特許), C H(広域特許), C M(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域特
許), F I, F R(広域特許), G A(広域特許), G B(広域特許), G R(広域特許), H U, I T(広域特許),
J P, K P, K R, L K, L U(広域特許), M C, M G, M L(広域特許), M R(広域特許), M W, N L(広域特
許), N O, R O, S D, S E(広域特許), S N(広域特許), S U, T D(広域特許), T G(広域特許), U S

最終頁に続く

請求の範囲

1. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であ
って:該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与せしめ、これ
により、該哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製が
阻害されることを含んで成る方法。2. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であ
って:該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体を投
与せしめ、これにより、該哺乳類のHIV感染細胞における
ウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。3. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であ
って:該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似
体のポリペプチド混合物を投与せしめ、これにより、該哺乳
類のHIV感染細胞におけるウイルス複製が阻害されること
を含んで成る方法。4. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であ
って:該哺乳類に、少なくとも1種類の膜透過程素、少なくとも
1種類の膜透過程素の活性タンパク質成分、少なくとも1種
類の膜透過程素のポリペプチド成分、及びその混合物より成
る群から選ばれる薬剤を低毒性有効投与量で投与せしめ、こ
れにより、哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製が

阻害されることを含んで成る方法。

5. 前記の薬剤がメリチンである、請求項4に記載の方法。

6. 前記の薬剤が:

ハチミツ毒素、

マルハナバチ毒素、

スズメバチ毒素、

ボールドフェスオオクマバチ毒素、

該毒素の活性タンパク質成分、

該毒素の活性タンパク質成分、及びその混合物、

より実質的になる群より選ばれる、請求項4に記載の方法。

7. 前記のメリチンの構造類似体が、連結している細胞結
合性配列を有する又は有さない両親媒性 α -ヘリックスを含む、
請求項2に記載の方法。8. 前記のメリチンの構造類似体が、Gly-Ile-Gly-Ala-Va
l-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-
Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly である、請求項2に記載
の方法。9. 前記のポリペプチド混合物がメリチン及びその構造類
似体Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Le
u-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly
を含む、請求項3に記載の方法。10. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であ
って:該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与せしめ、こ
れにより該哺乳類におけるHIV感染細胞の増殖が阻害され

ることを含んで成る方法。

11. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体を投与せしめ、これにより該哺乳類におけるHIV感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

12. 前記の構造類似体がAmf11及びメリチン様のGP41のペプチドである、請求項11に記載の方法。

13. 前記の構造類似体がAmf12及びメリチン様のGP41のペプチドである、請求項11に記載の方法。

14. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物を投与せしめ、これにより、HIV感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

15. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に、少なくとも1種類の膜細類毒素、少なくとも1種類の膜細類毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜細類毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤を低毒性有効投与量で投与せしめ、これにより、哺乳類におけるHIV感染細胞の増殖が低められる、又は阻害されることを含んで成る方法。

16. 前記の薬剤がメリチンである、請求項15に記載の方法。

17. 前記の薬剤が：

ハチミツ毒素、

マルハナバチ毒素、

スズメバチ毒素、

ボールドフェスオオクマバチ毒素、

該毒素の活性タンパク質成分、

該毒素の活性タンパク質成分、及びその混合物、

より実質的になる群より選ばれる、請求項15に記載の方法。

18. 前記のメリチンの構造類似体が、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親属性αヘリックスを含む、請求項11に記載の方法。

19. 前記のメリチンの構造類似体が、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly である、請求項11に記載の方法。

20. 前記のポリペプチド混合物がメリチン及びその構造類似体Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly を含む、請求項14に記載の方法。

21. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与せしめ、これにより、該哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。

22. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のため

の方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体を投与せしめ、これにより、該哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。

23. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物を投与せしめ、これにより、該哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。

24. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に、少なくとも1種類の膜細類毒素、少なくとも1種類の膜細類毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜細類毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤を低毒性有効投与量で投与せしめ、これにより、哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製が低められる又は阻害されることを含んで成る方法。

25. 前記の薬剤がメリチンである、請求項24に記載の方法。

26. 前記の薬剤が：

ハチミツ毒素、

マルハナバチ毒素、

スズメバチ毒素、

ボールドフェスオオクマバチ毒素、

該毒素の活性タンパク質成分、

該毒素の活性タンパク質成分、及びその混合物、

より実質的になる群より選ばれる、請求項24に記載の方法。

27. 前記のメリチンの構造類似体が、細胞結合性配列に連結している、又は連結していない両親属性αヘリックスを含む、請求項22に記載の方法。

28. 前記のメリチンの構造類似体が、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly を含む、請求項22に記載の方法。

29. 前記のポリペプチド混合物がメリチン及びその構造類似体Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly を含む、請求項23に記載の方法。

30. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与せしめ、これにより、該哺乳類におけるレトロウイルス感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

31. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体を投与せしめ、これにより、該哺乳類におけるレトロウイルス感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

32. 前記の構造類似体がAmf11及びメリチン様の

特表平5-504761 (3)

G P 4 1 のペプチドである、請求項 3 1 に記載の方法。

3 3 . 前記の構造類似体が A m f 1 2 及びメリチン様の G P 4 1 ペプチドである、請求項 3 1 に記載の方法。

3 4 . 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であつて：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物を投与せしめ、これにより、レトロウイルス感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

3 5 . 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であつて：

該哺乳類に、少なくとも 1 種類の膜透類毒素、少なくとも 1 種類の膜透類毒素の活性タンパク質成分、少なくとも 1 種類の膜透類毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤を低毒性有効投与量で投与せしめ、これにより、該哺乳類におけるレトロウイルス感染細胞の増殖が低められる又は阻害されることを含んで成る方法。

3 6 . 前記の薬剤がメリチンである、請求項 3 5 に記載の方法。

3 7 . 前記の薬剤が：

ハチミツ毒素、

マルハナバチ毒素、

スズメバチ毒素、

ポールドフェスオオクマバチ毒素、

該毒素の活性タンパク質成分、

該毒素の活性タンパク質成分、及びその混合物、

より実質的になる群より選ばれる、請求項 3 5 に記載の方法。

3 8 . 前記のメリチンの構造類似体が、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親属性αヘリックスを含む、請求項 3 1 に記載の方法。

3 9 . 前記のメリチンの構造類似体が、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly である、請求項 3 1 に記載の方法。

4 0 . 前記のポリペプチド混合物がメリチン及びその構造類似体 Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly を含む、請求項 3 4 に記載の方法。

の、H I V 感染細胞もしくは言い換えるなら H I V 増殖性細胞を選択的に破壊せしめることが可能なものでなくてはならない。

理解される通り、H I V ウィルスはレトロウイルスであり、従って最も適切には RNA ウィルスとして分類される。ところで、このような特定のレトロウイルスの RNA はレプリカーゼによって直接的に増殖されるのではなく、むしろ逆転写酵素の助成を有する DNA 合成の介在を必要とする。理解されている通り、この DNA は RNA ウィルスの増殖のための構型として働く。この DNA は宿主細胞のゲノムの中に後に一体化する。この一体化の現象はその後、新たなるウィルス細胞の生産をもたらす。

低毒性 (s u b t o x i c) 濃度の膜透類の毒素又はそのタンパク質もしくはペプチド成分を利用する本発明は、逆転写酵素を阻害せしめることによって低毒性濃度にてウィルス複型を妨害せしめること及び／又は H I V 感染細胞の増殖を阻害せしめることにより、多數の長所を併せてウイルスレガーバーを治療的に実質的なくすものと考える。

名称 "METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF MAMMALIAN INFECTIONS EMPLOYING MEDICAMENTS COMPRISING BYMBOPTERA VENOM OR PROTEINACEOUS OR POLYPEPTIDE COMPOUNDS THEREOF" (「膜透類の毒素又はそのタンパク質もしくはポリペプチド成分を含んで成る医薬品を利用する哺乳類の感染の治療のための方法及び組成物」) の、1989年4月18日に承認された Benton らの米国特許第4,822,508

明細書

哺乳類の H I V 感染症の治療のための方法及び組成物

発明の背景

1. 発明の属する技術分野

本発明は哺乳類の H I V 感染症の治療のための方法及び組成物に関し、そしてより詳しくは哺乳類宿主に導入され、そして該哺乳類の H I V 感染細胞におけるウィルスの複型を制限又は実質的に阻害することがそれぞれできる膜透類の毒素又はそのタンパク質もしくはペプチド成分を利用する哺乳類の感染症の治療のためのこのような方法及び組成物に関する。

2. 前述技術の説明

医学者は長い間 H I V 感染個体の治療のための有用な方法及び組成物を探している。本明細書にて H I V 感染症は H I V 及び H I V 2 感染症の両方を含むことを意図している。この観点において、本研究は H I V 感染症と競うための潜在的に有用な治療薬を探すこと目的とし、ここで該組成物は H I V 感染細胞のウィルス再生を阻害しうるが、しかし其大なる有害な副作用を有さないものである。より詳しくは、本研究の目的は従来の AZT の利用にとって代る治療剤である組成物を見い出すことにある。ところでこの組成物は有効性ウイルス細胞のレガーバーを含む又は実質的に制限するため

特表平5-504761 (4)

号は、天然の二次蛋白質、例えば膜細胞の毒素又はそのタンパク質性もしくはポリペプチド成分が抗病原作用を有することを教示している。この文献は更に、このような組成物は種々の疾患における抗ウイルス、制癌性又は抗癌作用を有することも述べている。より詳しくは、Bentonらの文献はミツバチ毒素の主成分であるメリチン (melittin) を、予め分っている感染症に対して抗ウイルス活性を有する様々な抗生物質と組合せて利用することを教示している。更にこの文献は、種々の治療的有効な量におけるメリチンと様々な抗生物質との組合せにより相乘的な利点が得られることが教示している。

Bentonらの従来技術文献に詳細に説明されている通り、ミツバチ毒素における主成分であるメリチンは実質的に26個のアミノ酸残基を含むポリペプチドである。これらのアミノ酸残基はGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Gln-Gln-アミドを含む。更に、この発明者は、メリチン類似体であって、少なくともその最後の6個のアミノ酸 (C-末端) が変異して6個のグリシン残基に置き代わられているものの直接的な作用が、メリチンに類似する治療的利点を有すことを発見している。このアミノ酸類似体は、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly の構造を有す。

従って、例えばAZTにより成し遂げられる常用のHIV治療に関連するそれぞれの有害性を更に回避しながらも、哺乳類

細胞に感染しうるウイルスのリザーバー細胞をなくす又は大いに少なくすることが可能な安全且つ有効な手段におけるHIV感染細胞の治療のための方法及び組成物が長い間所望されていた。

発明の目的及び概要

従って本発明の目的は、膜細胞の毒素又はそのタンパク質もしくはペプチド成分を利用する、哺乳類におけるHIV感染症の治療のための改善された方法及び組成物にある。

本発明の他の目的は、哺乳類におけるHIV感染症の治療のためのこのような方法及び組成物であって、ここで該膜細胞毒がミツバチ (honey bee) 毒、マルハナバチ (bumble bee) 毒、スズメバチ (yellow jacket) 毒、及びボールドフェースオオクマバチ (bald faced hornet) 毒、該毒の活性タンパク質成分、該毒の活性タンパク質成分並びにその混合物より実質的になる群より選ばれる方法及び組成物の提供にある。

本発明の他の目的は、哺乳類におけるHIV感染症の治療のためのこの方法及び組成物の提供にあり、ここで該方法は哺乳類に有効な低毒性投与量のメリチンの類似体又はそれ自体を投与せしめることにより、哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製を実質的に阻害せしめることを含んでいる。

本発明の他の目的は、哺乳類におけるHIV感染症の治療のためのこの方法及び組成物の提供にあり、ここで該

方法は哺乳類に有効な低毒性投与量のメリチンとその構造類似体のポリペプチド混合物を投与せしめることにより、HIV感染細胞におけるウイルス細胞の複製を阻害せしめることを含んでいる。

本発明の更なる目的及び利点は、哺乳類のHIV感染を治療するための、安全且つ有効であり、そしてこのような疾患の治療のための従来の治療法のそれぞれに関連する有害性を更に回避せしめる、改善された方法及び組成物の提供にある。

図面の簡単な説明

図1はメリチン濃度に依存する未処理コントロールのパーセンテージとしての、非感染及びHIV感染細胞により得られる細胞増殖の比較を示すグラフ図である。

図2はメリチン濃度に依存する未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染Tリンパ球細胞 (KE37-1/B) の培養上清液の標準細胞系と比較した逆転写酵素の活性 (RT%)、そして更には感染性 (INF%) の比較を示すグラフ図である。

図3はメリチン類似体の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、非感染及びHIV感染細胞により得られる細胞増殖の比較を示すグラフ図である。

図4は、メリチン類似体の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染Tリンパ球細胞 (KE37-1-B) の培養上清液の、標準化細胞数と比較した逆転写酵素の活性 (RT%) 及び感染性 (INF%)

を示すグラフ図である。

図5はHIVウイルスのGP41分子のカルボキシ末端領域のグラフモデルである。

図6はメリチンの濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖の比較を示すグラフ図である。

図7はメリチンの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図8はメリチン6の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖の比較を示すグラフ図である。

図9はメリチン6の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図10はメリチン4の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図11はメリチン4の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図12はメリチン2の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図13はメリチン2の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

特表平5-504761 (5)

図14はメリチンFの濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図15はメリチンAの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図16はメリチン3の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図17はメリチン3の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図18はメリチン1-20の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図19はメリチン1-20の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図20はマストバラン(mastoparan)の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図21はマストバランの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図22はAMP12の濃度により比較した、未処理コント

ロールのパーセンテージとしてのHIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。AMP11の濃度により比較した、未処理コントロールのパーセンテージとしてのHIV感染及び非感染細胞についての細胞増殖のパーセンテージは図22に示す結果と同じである。

図23はAMP12の濃度の関数としての感染性細胞のパーセンテージを示す。AMP11の濃度の関数としての感染性細胞のパーセンテージは図23に示す結果と同一である。

図24はMHCペプチドの濃度により比較する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図25はMHCペプチドの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図26はDMSO(溶媒コントロール)の濃度により比較した、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図27はDMSO(溶媒コントロール)の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図28はHOLSTペプチド(陰性コントロール)の濃度により比較した、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図29はHOLSTペプチド(陰性コントロール)の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図30は種々の時間間隔でメリチンの濃度により比較したP24生産のパーセンテージを示すグラフ図である。

図31は3時間目にてメリチンの濃度にて比較した細胞及び上清液におけるP24生産のパーセンテージを示すグラフ図である。

図32及び33はそれぞれメリチンの存在下において3時間及び14時間インキュベーションせしめた後の細胞と上清液におけるP24の濃度を示すグラフ図である。

図34は種々の濃度のメリチンと3時間及び14時間インキュベーションせしめた後の、それぞれの無細胞上清液中ににおけるP24測定へのメリチンの効果を示すグラフ図である。

図35は、マウスによる長期毒性試験を示し、より詳しくは特定の毒素の投与を開始してから種々の時間にて得られた、この毒性試験の際に用いた種々の毒素に対するマウスの有効体重を示す記録例である。

図36は毒性試験に用いた物質の投与を開始してからの経過日数の関数としての、長期毒性試験におけるマウスの体重を示す記録例である。

図37は投与を開始してから種々の日数でのハチミツ毒素の利用の関数としての、個々のマウスの体重を示す記録例である。

図38は投与を開始してから種々の日数での、スズメバチ

毒素の利用の関数としてのマウスの体重を示す記録例である。

図39は投与を開始してから種々の日数での、オオクマバチ混合物毒素の利用の関数としてのマウスの体重を示す記録例である。

図40は投与を開始してから種々の日数での、スズメバチ混合物の利用の関数としてのマウスの体重を示す記録例である。

図41はマウスについての長期毒性試験を示し、これは毒性試験に従ってハチミツ及びスズメバチ混合物の付与されたマウスの種々の解剖器官それぞれの顯微鏡試験をまとめた記録例である。

図41Aは、図40に紹介する種々のデーターの解説を示す。

図42はメリチン及びその構造類似体の構造を示す。

好ましい環境の説明

材料と方法

材料

以下に詳細のKE37-1(非感染)及びKE37-1/Mβ(感染)細胞系はアメリカ合衆国におけるNIHのDr. Robert Gallo研究所より市販され、これを1ミリリッター当りベニシリン約100ユニット、ストレプトマイシン100μg及びフンギゾン(fungizone)(アンフォテリシンB)約0.25μgを含む、10%の仔牛血清更に添加されている RPMI 1640 (GIBCO)

の培地に増殖せしめた。下記に詳細のヒト間充組織細胞系LC5及びLC5-HIVは1989年3月9日にフランス国、パリのCollection De L'Institut Pasteurに寄託されており、それぞれ承認番号I-842及びI-843が付与されている。LC5及びLC5-HIV細胞系を、10%の仔牛血清の添加されている RPMI1640培地において増殖せしめた。

合成ペプチド

GP41由來のメリチンペプチド及び類似体は市販されているペプチド合成装置(Biolynxモデル、Pharmacia Biochrome, Cambridge UK)を用い、この装置(Pharmacia Biochrome, Cambridge UK)に供給する予め秤量したアミノ酸O P E P エステルにより合成した。この合成手法は、この装置のためのマニュアルに詳細の通り、Fmoc手法に基づく。アシル化のレートをバイオプラス(Bioplus)ソフトウェアにより、その製造により付与されたプロトコールに従い、600nmにてアニオニン色素(アッシュバイオレット17;ジメチルホルムアミド1.00ml及びジイソプロピルエチルアミン0.14ml当り3.0mg)の遊離を利用してモニターした。この原理は対イオン分布モニター(Counter ion distribution monitoring: CDM)として知られ、そしてSalisbury, S. A., Treaner, E. J., Davies, J. W. 及びOwen, D., E., I., A., (1990)

J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1990頁538-540に詳細されている。利用するリンカーはペプチドアミドの遊離をもたらす((ウルトロシンC) Ultrosyn C, Pharmacia Biochrome, Cambridge UK)。

酸性に不安定なリンカー、ウルトロシンC(0.1eq)への第1のカップリングを対称無水物(0.4eq)を用い、ジメチルアミノビリジンの添加(0.05eq)により行った。これは、Fmoc基の遊離により測定されるものとして、1時間後に少なくとも80%のカップリングをもたらし、そして未反応部位は無水酢酸を用いてキャップせしめた。その後のカップリングは、市販されている活性エステル(Pharmacia Biochrome, UK)を用い、利用したソフトウェア(上記)によって自動的に行われるCDMによって決定されるカップリング時間にわたり行った。典型的なカップリング時間は一般に4倍過剰量のエステルを用いて1時間である。Serを黒色となる迄ジヒドロキシベンゾトリゾールを用いてカップルせしめた(1.5-2時間)。Fmoc基を5倍のベッド容量のビペリジン(ジメチルホルムアミド中で20%)により除去せしめた。ジメチルホルムアミドを使用前に蒸留せしめ、アミンを含まないようにせしめた(Biolynxに関するプロトコールに詳細のジントロフルオロベンゼン試験により測定した)。これらのカップリングは何ら特別な問題を提供せず、そして粗ペプチドは高压液体クロマトグラフィー(HPLC、以下参照)により

80%以上の純度であった。

該ペプチドを2%のアニソール及び2%のエタンジテオールの添加を伴ってトリフルオロ酢酸を用い、2時間かけて樹脂から切り離し、その後エーテル沈殿せしめた。このペプチドをTSK120T逆相カラム(7.5×300mm)(Pharmacia, Sweden)におけるHPLCにより純度95%以上に迄精製せしめた。このペプチドは、0.1%のトリフルオロ酢酸中における0~80%のアセトニトリルの90分にわたる直線勾配を用いることにより、65%のアセトニトリル(5と75%の間)にて典型的に溶出させた。この配列をアプライドバイオシステム(Applied Biosystem)シーケンサーにより、製造者に従うタンパク質シーケンシングにより確認した。

GP41類似体及びマストバランの合成はメリチンについての詳細の通りに行った。利用したメリチン類似体及びその他のペプチドのリストは図42に記載した。

方法

図1~4をより詳しく説明すると、メリチン及びその特定の類似体をHIV感染Tリンパ球細胞へのそれら的作用について試験した。これに加し、以下の細胞系をこの試験において利用した: KE37-1(非感染)及びKE37-1/HIV β (HTLV- β により感染)。これらの感染細胞を試験条件のもとで7日間にわたり、37°Cの温度及び5%のCO₂の存在下においてインキュベートせしめた。RPMI1640の培養培地(GIBCO)を利用し、そして更にこれにペ

ニシリソウ約100ユニット、ストレプトマイシン100μg及びフンギゾン(アンフォテリシンB)約0.25μgを1ml当たりに含む10%の仔牛血清を添加せしめた。これは培地100ml当たり、1mlの抗生物質-抗真菌溶液(GIBCO:カタログ番号04305240)に相当する。種々の濃度の前記の物質の存在下において、1週間にわたるインキュベーションの後、以下の試験をこの培養物について行った。第1の試験はMTT試験を利用することにより提供される、HIV感染細胞数の関数としての相対細胞濃度を測定する目的のために行った。このMTT試験はT. Mosmannの、“Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays,” *Journal of Immunological Methods*, 第65巻(1983)、頁55-63に従い、マイクロタイヤープレート中で行った。このMTT試験は若干改良した: 10μlのMTT溶液(PBS中に5mg/mlのMTTを溶解し、濃度により除菌した; MTTは3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル-2,5-ジフェニルテトラゾリムブロミドである)を全てのウエルに加えてある。細胞をMTTと、37度で4時間、5%のCO₂雰囲気下においてインキュベートせしめた。黒色のMTTを代謝的に活性な細胞によって青色のホルマザンへと還元する。この反応をイソプロパンール中における0.04NのHCl 200μlを全てのウエルに加えることにより停止させ、そしてこの色素を抽出せしめる。全てのホルマザン結晶を溶解せしめるために得られるこの溶

液を強く混合した。この溶液の吸光度を 600nm で測定した。この吸光度はこのような条件下の細胞密度と比例する。

第2の実験はPoleszらにより詳細のPNAS 77(1980): 1415-1419に見い出せる試験を改良した方法を利用することにより、処理せしめたHIV感染細胞培養物の上清液中における逆転写酵素の活性を測定するために行なった。第3の試験は処理せしめたHIV感染細胞培養物の上清液の相対感染性を測定することを目的として行なった。これに間に、非感染化のHIV感受性ヒト胎児肺細胞(LC5)を試験すべき培養上清液においてインキュベートした。これに続き新鮮培地中でのこの細胞の3日間培養を行なった。次にこれらの細胞をHIV特異的タンパク質の生産について試験した。

HIVタンパク質の存在を確認する方法は血清学試験を介して行なった。ここでは、第1抗体であるこれらのタンパク質に対する抗体及び第2抗体であるこのイムノグロブリンに特異的な抗体、そしてこれに結合している西洋ワサビペルオキシダーゼを利用している。識別化のため、抗体-抗原複合3-アミノエチルカルバゾールを利用した。この物質は水に不溶性であった。この方法は間接的イムノペルオキシダーゼ比色法としてよく知られる。この方法はMellertらの "HTLV-III/LAV-Antikörpertest: Indirekte Immunperoxidasefärbung (HTLV-III/LAV抗体試験: 間接的イムノペルオキシダーゼ染色) AIDS-PORSCHUNG

(AIP) 1986年2月、第2巻、頁106-107に詳しく述べられている。図1-4に見られる通り、メリチンは $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度でHIV感染細胞及び非感染細胞両者に毒性であることがわかる。これに間違して、本試験データーの分析を更に補助するためにマウスに対する毒性試験を以降に提供する。以上の他、図3に示される通り特定のメリチン類似体は明らかにメリチンほど毒性でない。しかしながら、この類似体はより高い投与量、即ち $10\mu\text{g}/\text{ml}$ でHIV感染細胞に対して選択的な増殖阻害作用を示す。更に、メリチンが感染及び非感染細胞の両者に毒性である濃度 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ にて、感染細胞の増殖はメリチンを利用することによりおよそ7日後にはほぼ80%下げるが、非感染細胞の増殖は容易には影響を受けないことを本発明者が発見したことによればきである。

以上の他、図1-4に示す試験データーは $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のメリチンを示し、これでは細胞の増殖のレベルは未だ影響されず、この細胞の感染する能力及び逆転写酵素の活性はほぼ0値に近寄ることが明らかである。これは図2を参照することにより最もよく分る。

図4を参照することにより最もよく分る試験データーは、メリチン類似体が逆転写酵素の活性及び上清液処理化HIV感染細胞における感染性ウイルス細胞の量も低めることができることを示す。この作用は非感染細胞には毒性でないが、HIV感染細胞には明らかに毒性である濃度範囲において生ずるものと考えられる。

まとめると、図1-4に示す試験データーは、メリチンが低毒性濃度で逆転写酵素を阻害することにより、ウイルス複製を阻害するための治療に有用であることが考えられることを示す。更に、メリチンはHIV感染細胞の増殖を選択的に阻害するものと考えられ、このことは哺乳類におけるウイルスリザーバーの構造を可能とする。

図1から4に示す試験結果を更に裏付けるために更なる試験を行なった。図6から34迄を参照することにより最もよく説明されるこれらの試験それぞれにおいて、メリチンがHIV感染細胞を阻害する考えられるメカニズムを調べた。序論により及び図5をより詳しく参照することにより、HIVタンパク質GP41の表面のエネルギー最小化試験を、ニューラルネットワークコンピューティング(neural network computing)原理に基づく二次構造予測におけるCHARMMアゴリズムを用いて行った。ここで利用するニューラルネットワークプログラムの用途はアミノ酸配列からの予測二次タンパク質構造であることが理解されるべきである。このネットワークはアミノ酸残基を3つの型の二次構造、即ち、アルファヘリックス、ベータシート及びランダムコイルに分けるようになっている。既知の二次構造を有するタンパク質の大量のセットをこれに嵌め込むことにより、このニューラルネットワークはこのネットワークにとって新規なるタンパク質の二次構造について、その一次構造に基づいて予測することが可能となる。ヒト免疫不全ウイルス(HIVタンパク質GP41)の、ニューラルネ

ットワーク法に基づくコンピューターモデル化による分析は、H. Andreasenらの "Analysis of the Secondary Structure of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) Proteins p17, gp120 and gp41 by Computer Modeling Based on Neural Network Methods," Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 第3巻、頁615-622に見い出せる。より詳しくは、これらの研究により導かれる考察は、GP41タンパク質の2つのトランスメンブランセクションがメリチンの構造とのある程度を同一性を有することを示唆している。これに関して、この同一性はかなり注目すべきであり、その理由はメリチンとはかなり異なっているその他のメリチンの類似体が同じHIV阻害作用を有することが明らかであるからである。従って、メリチンにおけるいくつかのアミノ酸は、両親媒性が保持されることを条件に該分子の活性の変化を伴うことなく交換されることが可能であり、そして4つのメリチン分子のポリマー化が荷電相互作用により可能であることが明らかである。これらのデーターから導かれる考察であって以降により詳しく説明することは、即ち、メリチンは主なHIVタンパク質のうちの1つ、即ち、HIVタンパク質GP41と相互作用するものと考えられることがある。これは、GP41のトランスメンブラン領域とメリチンが図5に示す通り類似する理由より考えられる。

メリチンはアミノ酸26個分の長さの両親媒性ペプチドであると考えられる。高いイオン強度の水溶液中では、メリチンは4量体の構造を選択する。しかしながら、低イオン強度

ではメリチンはモノマーのランダムコイルとなる。生理的なイオン強度ではこの2つの型の分布が等しくなるようである。従来の研究が示すには、メリチンはモノマーヘリックスを形成せしめることにより細胞膜の疎水環境に適合することができることを示している。このヘリックスの一方の側面には電荷が分布し、そして膜に結合している側面には電荷は負荷されていない。この研究は、メリチンポリマーの表面がまわりの脂質に向いており從って電荷が負荷されていないことを更に示唆する。更に、メリチン分子のその他の特有な特徴は、約120°のねじれがプロリン(アミノ酸番号14)によってこのメリチンヘリックスに導入されていることである。類似のねじれが上記のHIV-CP41メリチン様配列に見い出せる。

初期の研究は、メリチンがいくつかの作用を有することで知られていることを示す。これらの作用は細胞表面結合プロセス及び重合プロセスとしてより詳細され、ここではアルファ-ヘリックスはチャンネルを形成するように配置している。更に、C末端、即ち尾部の6個のアミノ酸によって結合することは細胞溶解のために重要であることが示されている。この事実は以降に詳述する実験的試験データーを理解する上で非常に重要である。メリチンがチャンネルを形成する正確なメカニズムはよく理解されていないことが理解されるべきである。しかしながら、メリチン分子はその塩基性C末端によってリン酸陰イオンと結合することが考えられ、これによって10個のホスファチルコリン分子と相互作用する。メリ

チン分子が結合したら、これは膜の外層質層の中に入り込み、これによって膜の構造を乱すと考えられる。この働きに続き、膜の外層に孔が形成され、これによりイオンの透過性は高められ、その後膜は破れる。この膜において形成されるチャンネルはメリチン分子により安定化される。チャンネルの形成は細胞の溶解もたらし、これは以降のメリチンの毒性に関連する。これはアルファートキシン及び補体が細胞毒性であるメカニズムと比較することができる。これらの分子は膜に広がることもでき、これによって同じ結果をもたらす孔が形成される。

チャンネル形成能力を含む両親媒性ペプチドの作用に加え、ホスホリバーゼA2における作用が詳細され、これも二種のタンパク質間の両親媒性相互作用を含む。このケースにおいて、メリチンはおそらく酵素タンパク質ホスホリバーゼA2の疎水部分と相互作用するか、又はそれはメチル化リシン脂質相互作用に起因しうる。以上の他、メリチンの作用は細胞内である可能性もある。例えば、メリチンは成長ホルモンの分泌をもたらす、下垂体前葉製剤における内因性ホスホリバーゼA2を刺激せしめることが知られる。

図6から34にそれぞれ示す一連の実験は両極端を調べるためにデザインされている。これらの試験は特にウイルス遊離の阻害及び/又は低められた他の細胞への感染能力を有するウイルスの遊離を調べるためにデザインされている。他の細胞に感染する低められた能力は、例えばグリコシル化阻害剤により示され、ウイルス遊離への直接的な作用はアシル化阻

害剤、RT阻害剤及びメリチンにより示される。ところで、この実験のデザインの最も重要な特徴はメチル化リシンの毒性の検出である。本実験は星状細胞腫細胞系LC5-HIV(クローニング感染細胞)及びリンパ細胞腫細胞系KE37-I/II β (HTLV-II β によるクローニング感染細胞)の両者において行った。両ケースにおける結果は実質的に同じであった。

一連の本実験において、HIV遊離は完全自動化研究室ロボットシステムにより試験し、これはBiomek 1000としてBeckman Instrumentsにより製造されている。このシステムは以下の段階を行う。第1に、恒温的に感染された細胞(クローニング)をマイクロタイターブレートにまき、そして7日間増殖させる。次に、これらをメリチンにより、図に示す期間の最終日又はその途中迄のいづれかにて作用を受けさせる。生存細胞数をMTT、即ち代謝(デヒドロゲナーゼ)試験により定量する。このMTT試験は自動で行う。毒性作用は実験時に調べ、別のコントロール実験において調べたのではない。更に、最終洗浄より24時間から7日間の様々な経過期間由來のウイルス細胞を含む上清液をこの培養物から回収し、そして抗原又はウイルスの酵素の逆転写酵素(RT)を利用するウイルス定量のためのアリコートを保存した。更に、アリコートをマイクロタイターブレート中の非感染細胞の培養物に加え、これらの非感染細胞に伝染するこのウイルス細胞の能力をその後調べた。これに因縁して、感染細胞の数をイムノペルオキシダーゼ染色法によって自動的に定量した。この試験結果は示した通り、メ

リチンの毒性(MTT試験)；初期培養物からのHIVの遊離(RT試験)；及びもとは感染されていない細胞に感染する遊離ウイルスの能力として表わした。

図6及び7を参照することにより最も分る通り、HIV感染細胞へのメリチンの全体的な作用は、感染細胞からのウイルス細胞の遊離の阻害であると考えられるが(図6)、しかしその天然の型は感染細胞に選択性に作用しないようである(図7)。この関係はメリチン6(図8と9)、メリチン4(図10と11)、メリチンE(図12と13)、メリチンP(図14と15)、メリチン3(図16と17)及びメリチン1-20(図18と19)それぞれに關しても示された。このデーターから得られる情報は注目すべきであり、その理由はメリチンの膜への作用はメリチンのそのC末端を介しての細胞への表面結合に依存すると考えられるからである。初めに説明した通り、この結合特性はlys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Arg-Argのアミノ酸配列を含むC末端配列に基づく陽電荷に依存するとも考えられる。メリチンの作用が既知のチャンネル形成のメカニズムに基づくか、又は知られていないプロセスによるものかを調べるために、本発明者は(1-20)-6-(Gly)-アミドを試験した。この型のメリチンの電荷の欠如に基づき、これはその両親媒性特性と同じ方法において作用し、そして細胞表面との特異的な相互反応に依存しないものと考えられていた。しかしながらこの発明者の仮説に反して、図18及び19を参照することにより最もよく分る通り、細胞表面に特異的結合せず、

そしてそれ故より毒性の低いメリチン類似体は、ウイルス細胞遊離を阻害し且つHIV感染細胞を選択的に殺傷もすることがはっきり認められた。この実験データは、メリチンの毒性、細胞毒性効果が感染細胞の選択的な殺傷をおそらくマスクすることを示唆する傾向にあった。これはメリチンの溶解特性がその抗-HIV作用に含まれていない可能性を予測させる。従ってこれは新規であり、且つ今迄開示されていないメリチンの作用の顕著である。

更に試験結果は天然のメリチンがHIV感染L C 5細胞を溶解せしめることを明白に示す。例えばこの試験データーは、この作用の性質がこの臨界濃度の現象に間連すると考えられることを示した。より詳しくは、この臨界濃度に達している場合(10 μg/ml)、全ての細胞、即ち、非感染及び感染細胞は殺傷される。この作用はHIV遊離における作用よりも10倍高い濃度で生ずる。メリチンCOOHを試験し、そしてこれはメリチソアミドよりも効力が弱いことがわかった。以上の他、2種類のメリチン類似体を試験した。これらは位置21-26において陽電荷アミノ酸の結合性尾部が欠如していた。これら両者のメリチン類似体はHIV感染細胞に同一と判断される作用を有し、即ちこれらの感染細胞は選択的に殺傷された。例えば、10 μg/mlにて、半数の感染細胞が殺傷され、そして非感染細胞は實質的に影響を受けなかった。更に、臨界濃度での細胞溶解に基づき、メリチンの毒性として説明されることができる細胞の溶解は、利用した濃度において観察されなかった。メリチン類似体の

作用は類似体の濃度の上昇により、感染細胞の生存率を定常的に低下させることを示した。このメリチン類似体の作用は簡単には説明できない。即ち、感染細胞は非感染細胞と同程度に明らかに生存しており、従ってもしHIV遊離が阻害される場合、それらは非感染細胞よりも速い速度で死滅することはないであろう。更に、両親媒性構造を介して作用する、抗ウイルス物質としてのメリチンの作用はメリチン(1-20)の作用により更に実証された(それぞれ図18及び19)。これに関して、メリチン1-20はその分子の細胞結合部が欠如していることを理解すべきである。しかしながら、この類似体はそれにもかかわらず天然のメリチン及びメリチン(1-20)-6-(Gly)-アミドと同様にHIV遊離を阻害した。更にこのメリチンは、陽電荷C末端を有さないメリチン、即ちメリチン(1-20)-6-(Gly)-アミドと同様に感染細胞の増殖を阻害した。従って、メリチンの抗ウイルス作用はメリチンの既知の細胞溶解メカニズムに依存せず、むしろメリチンの両親媒性及び膜カオトロピック作用に依存すると考えられる。従い、感染細胞の選択的殺傷はHIV遊離の阻害と相関する。これは現状では推測であるが、この作用はメリチンの現在迄分っていない作用に基づくであろう。

毒性マストバランの作用も図20及び21に示す。これは両親媒性ペプチドであるが、やや短めのものと考えられ、そして14個のアミノ酸残基のみを含む。従って、これはボリマー型においてのみ膜に分散することができる。類似の構造

を有すべビチド、即ちMHC(MAJOR組織適合性複合配列)及びGP41類似体、並びにマストバランは既に明らかである作用を有していないことに注目することが重要である。更に、メリチンと明らかに構造上類似していないコントロールペプチドも作用を有さなかった。

図30及び31をより詳しく参照すると、本発明者は、細胞内におけるウイルスタンパク質24の形成を測定することにより、メリチンにより処理された感染体(クローン培養物)においてこのウイルスタンパク質合成は全体的に低められることを発見した。このことは本質的に、該ウイルスにおけるメリチンの作用は、感染細胞から遊離する前のウイルスに攻撃することであり、しかも細胞培養物等へのメリチンの添加の最中又は直後にウイルスの歟を低下せしめることが可能であることを意味する。しかしながら、この事実はウイルス生産がこの培養を開始から約3~5日かけて最大値に達することを示している。この時点において、メリチンは培養物には存在していない。更に、得られるこれらの試験はメリチンが19時間の半減期を有し、且つそれは培養物に添加して2時間を経過した後はこの培養中において測定ができない、即ち、これは細胞に取り込まれていることを示す。この観察は「細胞遊離」ウイルス、即ち、上清液に放出されたウイルスにおけるメリチンの直接的作用によって説明される実験結果を全てを排除する。

膜透過程素の繰り返し投与の作用をマウスにおいて調べた。10匹のNMR1マウス(それぞれの性を5匹づつ)のグル

ープに以下の毒素を皮下的に付与した。ハチミツ、スズメバチ、オオクマバチ混合物又はスズメバチ科の混合物を0、4、7、12、14及び15日目に与えた。各動物にそれぞれ1、2、5、10、25及び50 μgの毒素を投与せしめた。その後、各動物は50 μgの毒素の注射を毎月5ヶ月にわたり受けた。第5のグループにはコントロール溶液を与え、これをコントロールとした。このデーターをそれぞれ図35から41Aにまとめた。臨床観察及び体重記録を繰り返し行った。この実験の終了時に、全ての動物を解剖し、そして組織学的検査を行った。この検査の結果より、マウスはこの4種の毒素に非常に耐性であることが考えられた。異常な成長又は隠微細的変化は見られなかった。

長期毒性試験に用いた材料と方法

種々の膜透過程素の利用

序論

哺乳類における膜透過程素の繰り返し投与の効果を評価するため、長期毒性試験をマウスにおいて行った。

試験装置

以下の膜透過程の種由来の毒素を試験した:

ハチミツバチ(アビスマリフェラ: *Apis mellifera*) (ref. Nr. BV02)、
スズメバチ(ベスプラマクリフロンス) (ref. Nr. YJ02)、

オオクマバチ混合物(白色頭オオクマバチ(ベスプラマクラタ: *Vespa velutina maculata*)、及びスズメバ

てマウス406号(スズメバチ科混合物)における脾臓から脾臓にかけての付着は慢性組織形成によるものであり且つよく血管化(vascularized)されていることが見出せた。

腸間膜リンパ腺及び脾臓における上記の変化は該毒素により引き起こされたものであろうが、しかしそれらは動物の健康状態に関連する無害な特徴であると判断される。

肺において小さな腫瘍が、マウス101号及び105号(ハチミツバチ)並びにマウス402号(スズメバチ混合物)において見られた。マウス407号(スズメバチ混合物)において、小さな結節性気管支上皮過形成が見られた。これらのタイプの変化は自発的に生じる。

コントロールマウス及びこれらの毒素の付与されたマウスにおいて、わずかな細胞浸潤物を有す肝実質細胞(hepatic parenchymal cells)の小さな壊死がしばしば見られた。更に、若干の慢性炎症変化が3匹のコントロールマウスにおける腎臓に見られた。

ローシャー(Rauscher)白血病マウスにおける生体内実験

ローシャー白血病マウスは一般に認められている哺乳類のレトロウイルス感染症のモデルである。このウイルスはマウスに赤血球生成白血病を生じさせ、これは赤血球の生産の増大の指標としての脾臓のサイズの増大により示される。脾臓のサイズは感染動物の死を実質的にもたらす疾患の進行の測定として取られる。6個のG1yの尾部を有すメリテン類似

体の作用をこのシステムにおいて試験した。

メリテンの抗ウイルス作用の原理の試験をBalb Cマウスで行った(生後12週間；全雌性)。この動物をケージ当たり4匹で飼育した。ローシャー白血球ウイルスによって、腹腔内注射によりこれらの動物を感染せしめ(一匹当り、0.2mlの容量において10⁶個感染性粒子(ウイルス))、その10分後に試験物質を皮下注射せしめた。これらの動物はコントロール(食塩水の類似注射を受けたもの)又は試験動物(メリテン類似体を受けたもの)として2つのグループに分けた。

上記の通りに感染せしめたバルブCマウスそれぞれ16匹の2つのグループに、リン酸緩衝食塩水(25mMのKH₂PO₄、150mMのNaCl、pH 7.8；PBSと称す)又はメリテン-6-gly(0.1mlの容量において、5μg/体重mg)のいづれかを注射した。このペプチドは100μg/mlとして溶解せしめ、そしてコントロール及び試験動物のそれぞれは皮下的に同容量(0.1ml)のPBS又はPBS+試験物質を注射された。この注射は、感染性ウイルスの注射の10分後に行った。2日後、これらの動物は新たなるメリテン類似体(10μg/体重mg)又はPBSの注射を、0.100mlの皮下注射として受けた。最初の注射から4日後、20μg/体重mgのメリテン類似体を用いて第3回目の注射を行った。全ての動物はメリテン類似体又はPBSの注射によって影響を受けることはなく、そして注射の無い期間生存し続けた。

考案

全体的な印象は、マウスは該4種の毒素、即ち、ハチミツバチ、スズメバチ、オオクマバチ混合物及びスズメバチ科混合物を少量の投与養生法において投与された場合にそれらに耐性であったことである。異常な肉眼的又は顯微鏡的変化は見出せなかった。

初めに説明した通り、メリテンは哺乳類におけるHIV感染症の治療を、おそらく主要HIVタンパク質の一つ、即ち、糖タンパク質GP41との相互作用によって提供すると考えられる。このことは、GP41のトランスメンブラン領域とメリテンとの間の類似性により考えられ、そしてこのことは図5を参照することによって最もよくわかる。

図5において示す通り、GP41は分子の膜結合部の顕著な特徴ありうる両親媒性部位を有する。GP41の両親媒性部は荷電アミノ酸の交替ループを形成し、ここでこのループの二本の脚部はメリテンの重合体に関連する構造と類似する電荷中和構造を形成せしめる。メリテンはGP41による分子内電荷中和の正常なる形成も妨げ、これによってGP41の構造を大きく変化せしめる。このことはウイルスの形成に影響を及ぼし、その理由はウイルスの形成は基礎的なウイルス免芽プロセスを行えるようにするGP41とウイルスタンパク質P17の他の相互作用に依存すると考えられるからである。ウイルス、例えばHIVは、ウイルスゲノムを含む細胞表面上の小さな膜芽(membrane bud)の形成を含むプロセスにより細胞から細胞へと広がるものと理

通常、感染マウスは2週間以内に150mg以上の量の脾臓を生じせしめる。このサイズは2.5g迄大きくなることができる。正常な脾臓は小さく0.1mg、大きくて0.15mgであり、95%のマウスがこの範囲内の脾臓を有す。2週間後に170g以上の脾臓を明らかな感染症として解釈し、正常値の上限値150mgと170mgの間の脾臓をボーダーラインのケースとした。2週間後、コントロールグループにおいて試験した全ての動物は150mgより大きい脾臓を示した。試験した動物のテストグループの25%においても150mg以上であるが170mg以下の脾臓を示し、そしてこれらはボーダーラインケースとして考えられる。しかしながら、残りは脾臓の増大の徵候を示さず、即ち、それは正常な動物としての100~150mg内であった。1匹の動物のみがコントロールグループにおける100%と比較して病理的であった。

以下の考察が上記の実験から導かれる。

1. 動物は、本特許明細書に詳細のインピット実験と匹敵する濃度におけるメリテン類似体による処置に生存し続ける。

2. 該メリテン類似体は、哺乳類におけるレトロウイルスの発育を阻害する。なぜなら、比較処置したコントロールグループにおいて疾患は100%発症したのと比べ、感染動物の75%は疾患を発症せしなかったからである。

3. HIVのみでなく、その他のレトロウイルスもメリテン及びその類似体により阻害される。

特表平5-504761 (12)

解されている。このプロセスは細胞表面の変化に感受性であると考えられる。例えば、脂質成分の添加は感染細胞からのウイルスの遊離を妨げることがよく知られている。この作用はおそらく細胞膜上のカオトロビック作用に基づく。しかしながら、この作用のメカニズムは未だ明確でない。

メリチンの相互作用を可能にするGP41の構造的特徴はアミノ酸770～856の間にあると考えられ、そしてここには770～794及び824～856の両親媒性配列が含まれる。図5を参照のこと。これらの配列の両親媒性は、低い全体的な疎水性と、組合されたそれらの高い疎水性運動により検出される。この二本の両親媒性鎖部は分子力学によってモデル化され、そしてそれらはその両親媒性に基づいて相互作用することができ、これによってそれらはトランスマシンブランループを形成することによって膜の中に侵入することが潜在的に可能となる。他方、それらは細胞膜の内部表面に浮いていることもできる。どのケースにおいても、メリチンとの相互作用はGP41の細胞質部分の部位の位置を変化せしめ、これによってウイルス形成の重要な先駆体と考えられるP17との相互作用を妨げる。これに因るとして、メリチン及びGP41の両親媒性配列824～856の間の興味ある類似性は、それらが共にその両親媒性ヘリックスにおいてプロリンを有することにある。この構造的特徴は初めて説明した通り、このヘリックスに120°のねじれを導入せしめ、従ってそれらがわずかに折り曲った形を有することを引き起こさせる。他方、メリチンは膜と相互作用することができる

こと、これによってカオトロビック剤として働きうる。このことから、その両親媒性性質によるであろう。カオトロビック剤の作用は膜に並んでいるリン脂質の配列の乱れを引き起こすことがあると考えられる。このような作用は膜の相転移期における変化及びその後のそれらの厚みの変化を引き起こす。期待された通りの、メリチンの浮化がカオトロビック効果を引き起こす事実は驚くべきことではない。しかしながら、この現象がどのようにしてウイルスの免芽プロセスに作用にするかは不明確であり、そして現在迄分っていない。しかしながら、大いなる抗HIV作用の機構又は変化が膜の脂質配列の並びにおいて生じた。更に、種々のリン脂質成分の添加も感染細胞からのHIVの遊離を防いだ。しかしながらこの作用を引き起こす脂質分子を同定することはできていない。

ところでメリチンはリン脂質と相互作用することが知られ、そしてこの未確認脂質分子のこの作用又はその結合はHIV遊離に関連するとも考えられ、これもメリチンの抗作用の説明を提供するであろう。おそらくこの脂質はリン脂質ではなく、その理由はリン脂質の添加はメリチンと非常に類似する作用を有すからである。

考察において、これらの試験結果はメリチンが二つの作用を有することを示唆する。即ち、メリチンはウイルスを不活性化せしめる短い第一期及び少なくともP24の生産を低める長い第二期を有すと考えられる。これらの特徴はメリチン両親媒性ヘリックスの特異的な構造に起因するであろう。更に、この試験の情報は、尾部構造が類似体の有効性を決定す

るがその作用の性質は決定しないことを示唆する。即ち、lys-Arg-lys-Arg-Gly-Glyを先端に含む尾部を有す類似体の有効濃度は該尾部を有さないメリチンの有効濃度の約100分の1である。上記の他、この試験結果は上清液の感染性が低毒性濃度でのメリチンによる単独処理によって引き下げられることを示唆した。これに關して、この処理は培養を開始することであり、そして感染性の測定は処理の7日後である。前記した通り、この型の培養物における最大ウイルス濃度値は培養の5日後迄到達されなかった。本発明者は上記より導くことができる考察は、処理7日後の認められているウイルス感染性がウイルスにおけるメリチンの直接的な作用にのみ基づくならば、メリチン又は活性フラグメントの効果が処理の5日後のような遅さで現れることは理解されるであろう。この可能性はなく、その理由は本発明者はメリチンが培養の開始後数時間以内に細胞によって吸収されることを発見したからである。更に、上清液の感染性の低下が、ウイルスの不適切な集積又は新たに合成されるビリオンの破壊と対立して、低められたウイルス生産に部分的に基づくなら、このような現象においてこれは細胞内及び/又はメリチン処理培養物の上清液中における低められたウイルスタンパク質の量に反映されるべきである。この仮説が正しいかを調べるために、本発明者はウイルスのタンパク質生産に関するマーカーとしてP24マーカーを選んだ。この試験データーは、メリチンとの3時間のインキュベーションにより、細胞及び上清液のP24のあるにしてもほんのわずか

な低下のみを示した。しかしながら、メリチンとの14時間のインキュベーションによっては、細胞及び上清液におけるP24のめざましい低下が得られた(60%迄の低下)。そして、細胞P24は上清液P24よりも早く且つより強く引き下げられると考えられる。更に、メリチンとの無細胞HIVのインキュベーションはP24抗原の検出を弱めることはなかった。これはウイルスの感染性を引き下げる効果を引き起こすのみであると考えられる。

マウスにおけるインピトロ実験も実施した。

以下の考察が上記の実験から導かれる。

1. 動物は、本特許明細書に詳細のインピトロ実験と対比する濃度におけるメリチン類似体による処置に生存し続ける。

2. 該メリチン類似体は、哺乳類におけるレトロウイルスの発育を阻害する。なぜなら、比較処置したコントロールグループにおいて疾患は100%発症したのと比べ、感染動物の75%は疾患を発症せしめなかったからである。

3. HIVのみでなく、その他のレトロウイルスもメリチン及びその類似体により阻害される。

本発明を最も実用的且つ好みやすい態様において詳細してきただが、これらの改良を本発明の範囲を逸脱することなくなされることが理解できる。

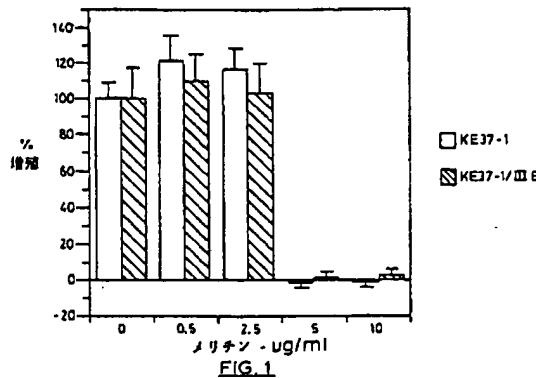


FIG. 1

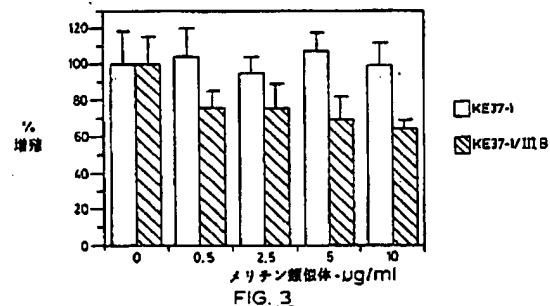


FIG. 3

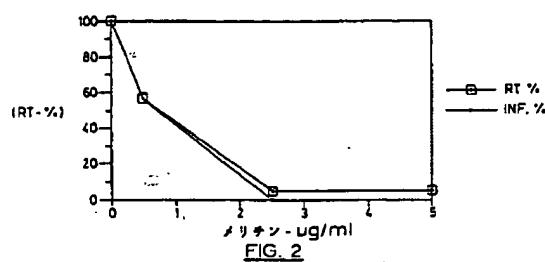


FIG. 2

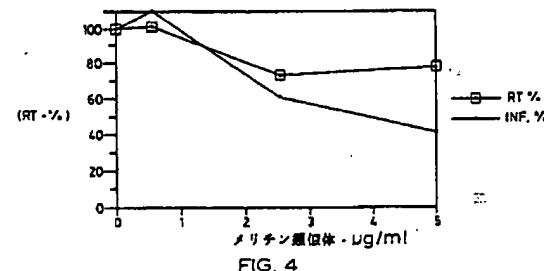


FIG. 4

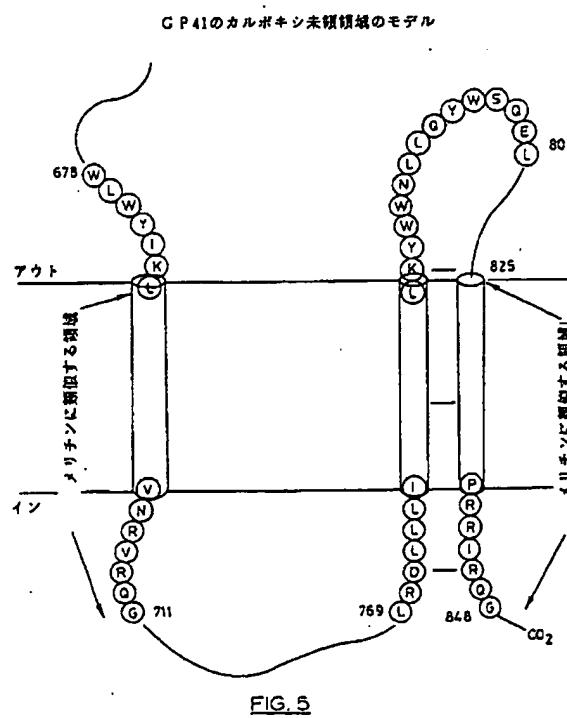


FIG. 5

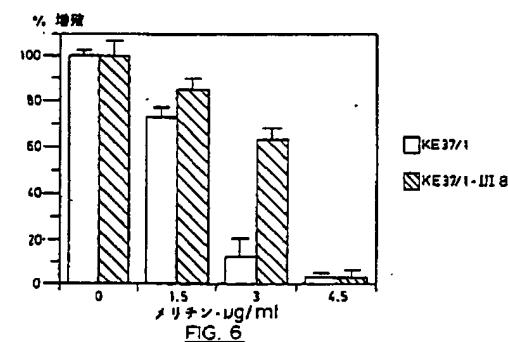


FIG. 6

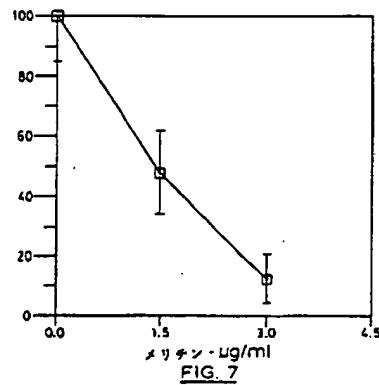
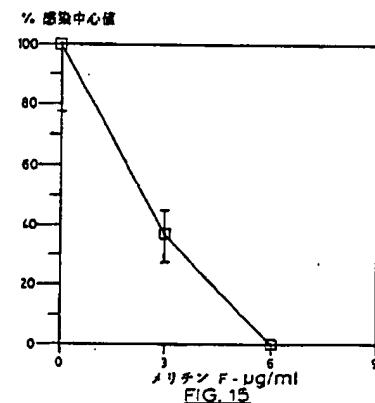
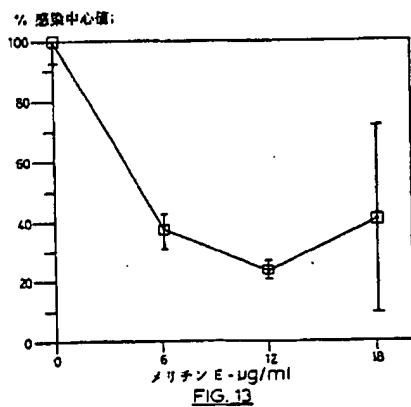
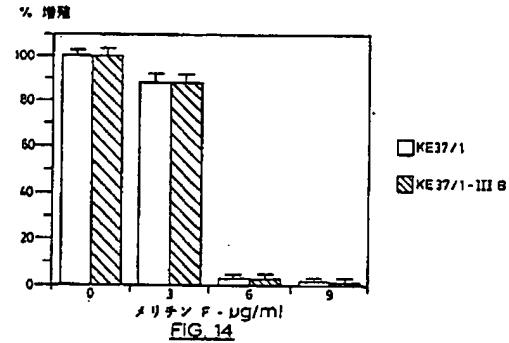
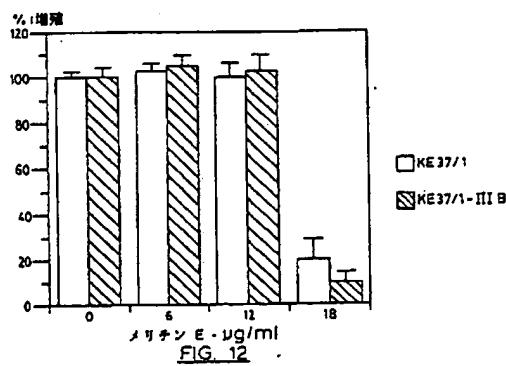
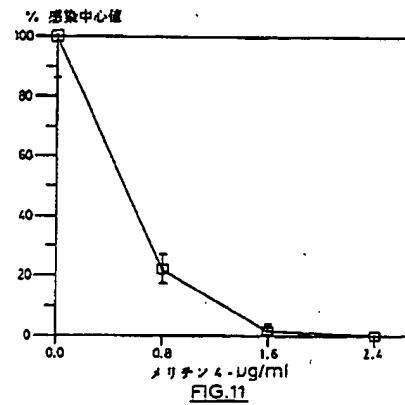
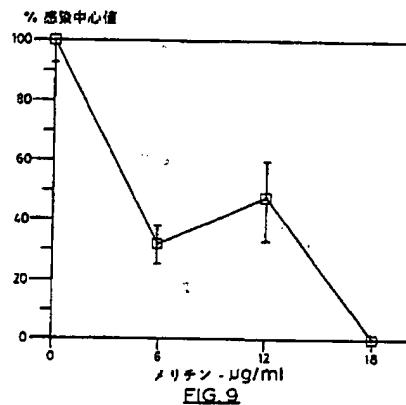
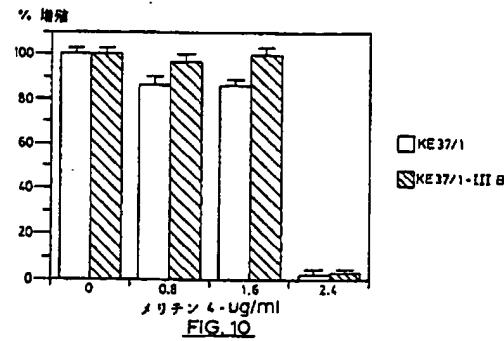
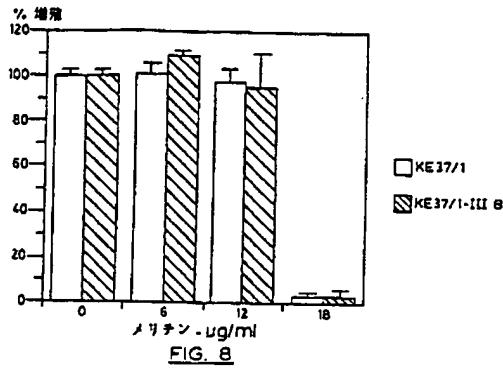
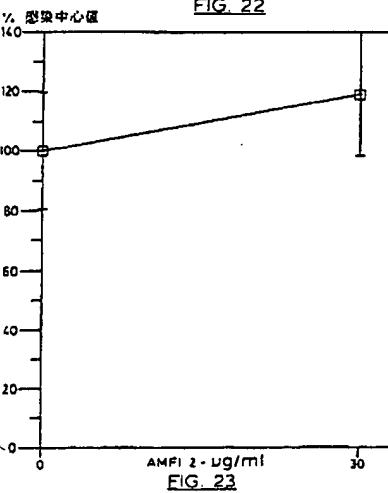
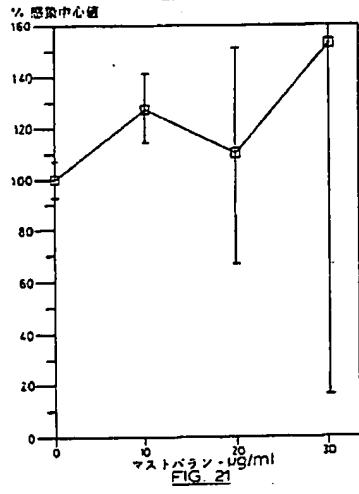
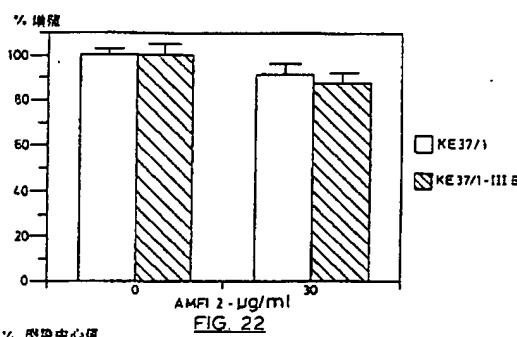
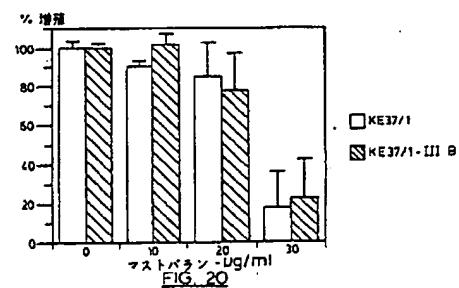
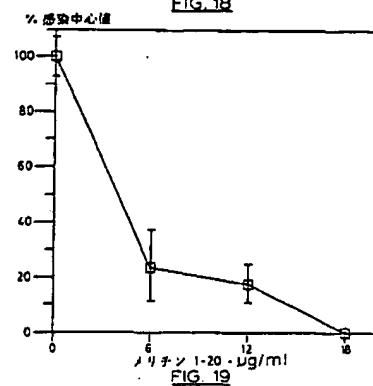
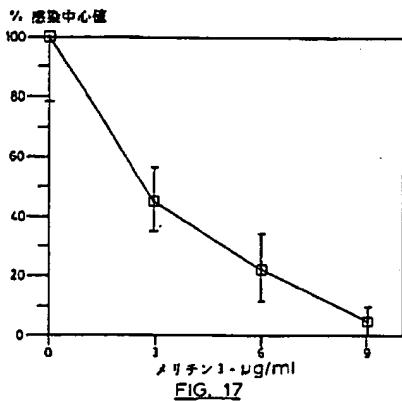
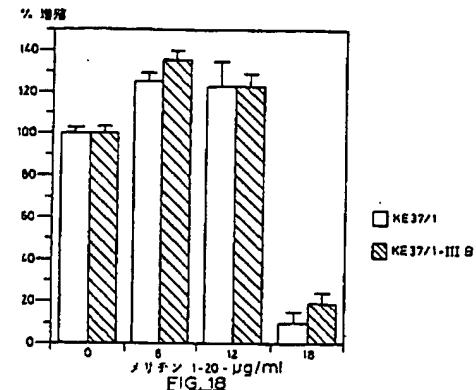
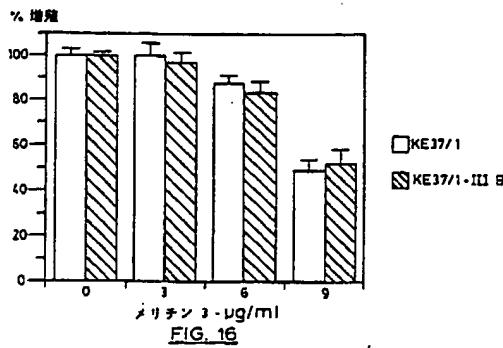


FIG. 7





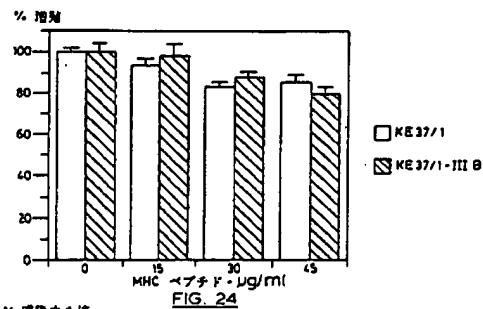


FIG. 24

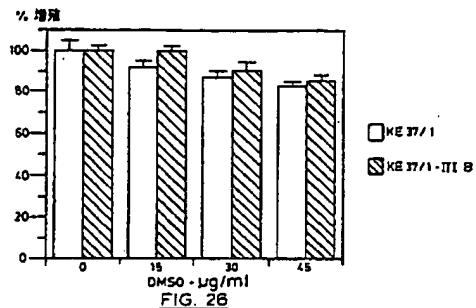


FIG. 26

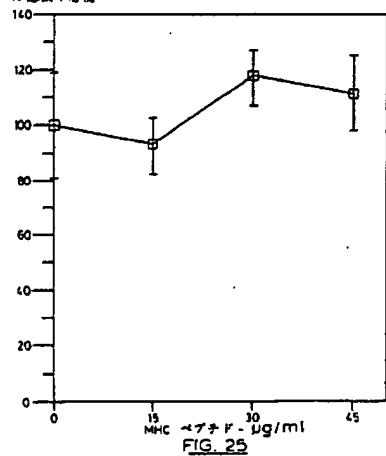


FIG. 25

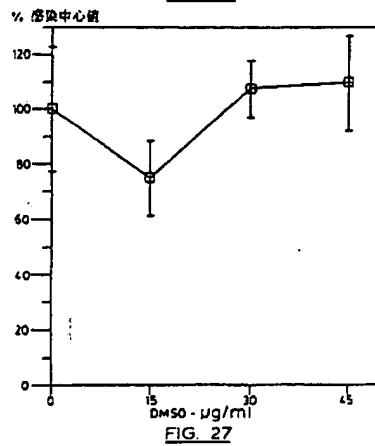


FIG. 27

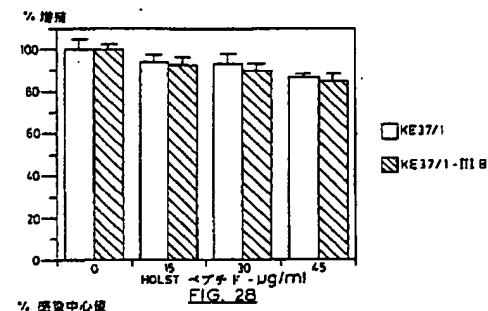


FIG. 28

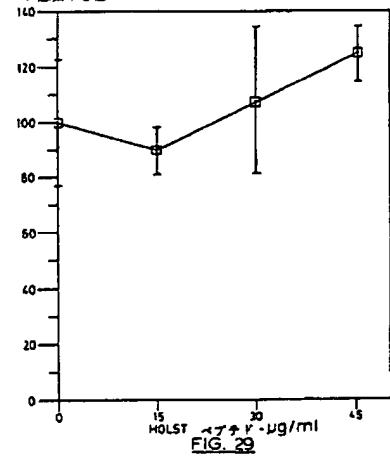
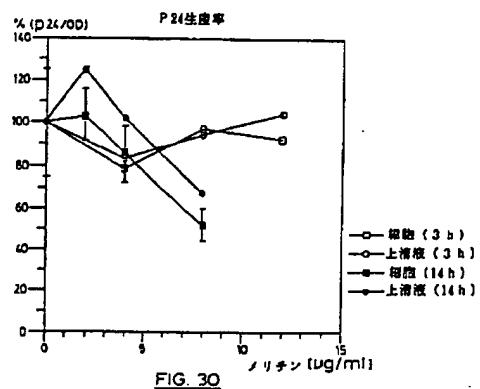


FIG. 29



細胞数に因縁付けられたP24生産率 (Oct. 25, 1990)

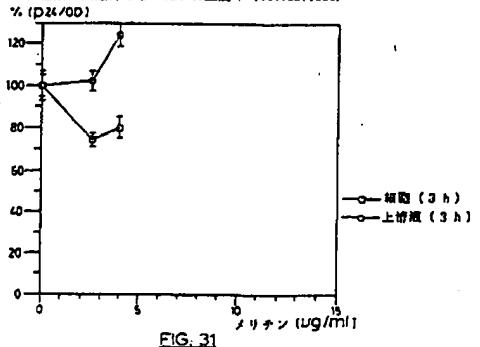


FIG. 31

ノリチンとの3 h 及び14 h のインキュベーション後の細胞及び上清液中のP24
p24(ng/00)

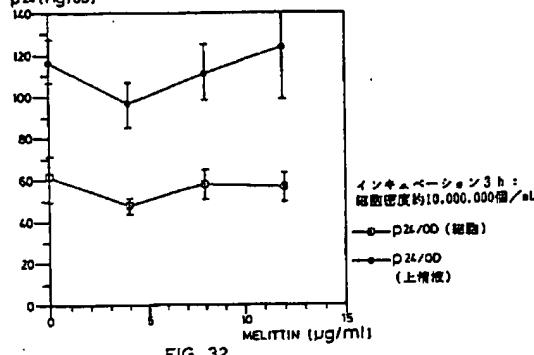


FIG. 32

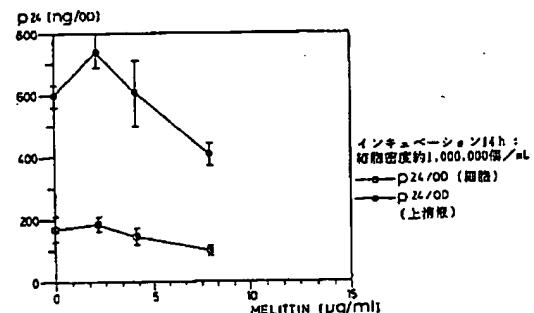


FIG. 33

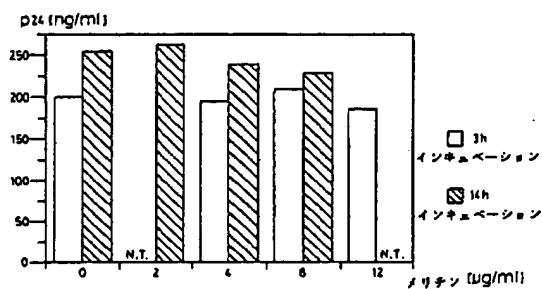
無細胞HIV含有上清液におけるP24測定
へのノリチンの影響

FIG. 34

FIG. 35

動物用毒素、長期毒性試験
グルーパー平均データー

グループ	性	投与開始後のある日の体重(g)												初期 200-248
		0	4	7	11	15	16	47	77	109	126	172	解剖	
コントロール	♀	21.4	22.0	22.2	22.4	22.6	22.8	23.0	23.2	23.4	23.6	23.8	23.8	200-248
コントロール	♂	34.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	200-248
ハチニン	♀	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	200-248
ハチニン	♂	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	200-248
スズノバチ	♀	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	200-248
スズノバチ	♂	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	200-248
トリハチ合物	♀	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	200-248
トリハチ合物	♂	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	200-248
スズノバチ混合物	♀	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	200-248
スズノバチ混合物	♂	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	200-248
ノリチン	♀	27.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	200-248
ノリチン	♂	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	200-248

FIG. 36

動物用毒素、長期毒性試験
グルーパー平均データー

マウス no.	性 別	年 齢	投与開始後のある日の体重(g)												(%) 208
			0	4	7	11	15	16	47	77	109	126	172	解剖	
1	コントロール	♀	29	29	30	31	31	31	32	32	32	32	32	32	208
2	コントロール	♂	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	208
3	ノリチン	♀	25	25	26	26	27	27	27	27	27	27	27	27	208
4	ノリチン	♂	29	29	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	208
5	ノリチン	♀	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	208
6	ノリチン	♂	24	24	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	208
7	ノリチン	♀	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	208
8	ノリチン	♂	24	24	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	208
9	ノリチン	♀	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	208
10	ノリチン	♂	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	208

FIG. 39

説明書添付。医薬品性状試験マウス
体重グラム (g)
グルーブ平均データー

マウス No.	物質 性	経与開始後の各日の体重 (g)														
		0	4	7	11	14	18	21	25	29	33	37	40	43	47	
201	生理活性物	9	24	25	39	35	24	26	39	38	43	40	38	40	38	40
202	生理活性物	9	30	31	31	32	32	33	34	35	33	36	34	36	35	36
203	生理活性物	9	24	24	25	25	25	26	26	25	26	27	25	26	26	25
204	生理活性物	9	22	23	23	24	24	24	28	28	43	40	39	40	39	40
205	生理活性物	9	26	26	26	27	26	27	40	40	43	39	37	39	36	36
206	生理活性物	9	25	25	25	25	26	26	28	28	28	26	24	25	25	25
207	生理活性物	9	23	23	23	24	24	23	27	26	25	24	25	25	24	25
208	生理活性物	9	26	25	26	27	26	26	39	32	31	24	26	24	26	26
209	生理活性物	9	23	24	24	24	25	27	26	28	28	29	28	29	28	29
210	生理活性物	9	26	26	26	26	27	27	28	29	29	20	20	20	20	20

100.00

FIG. 40

説明書添付。医薬品性状試験マウス
体重グラム (g)
グルーブ平均データー

マウス No.	物質 性	経与開始後の各日の体重 (g)														
		0	4	7	11	14	18	21	25	29	33	37	40	43	47	
201	生理活性物	9	29	30	39	39	31	22	22	21	21	21	21	21	21	21
202	生理活性物	9	27	27	26	29	28	30	31	32	33	32	32	32	32	32
203	生理活性物	9	20	21	22	22	23	23	27	27	29	29	29	29	29	29
204	生理活性物	9	21	22	23	23	23	23	35	35	34	34	34	34	34	34
205	生理活性物	9	26	26	27	27	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
206	生理活性物	9	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
207	生理活性物	9	25	25	27	26	27	26	26	26	26	26	26	26	26	26
208	生理活性物	9	23	23	23	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
209	生理活性物	9	26	26	26	27	27	28	29	29	29	29	29	29	29	29
210	生理活性物	9	26	26	26	27	27	28	28	29	29	29	29	29	29	29

100.00

FIG. 37

説明書添付。医薬品性状試験マウス
体重グラム (g)
グルーブ平均データー

マウス No.	物質 性	経与開始後の各日の体重 (g)														
		0	4	7	11	14	18	21	25	29	33	37	40	43	47	
101	ハチミツペチ	0	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
102	ハチミツペチ	0	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
103	ハチミツペチ	0	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
104	ハチミツペチ	0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
105	ハチミツペチ	0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
106	ハチミツペチ	0	24	23	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
107	ハチミツペチ	0	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
108	ハチミツペチ	0	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
109	ハチミツペチ	0	26	27	26	27	26	27	26	27	26	27	26	27	26	27
110	ハチミツペチ	0	24	24	25	24	24	25	24	24	25	24	24	25	24	24

100.00

FIG. 38

説明書添付。医薬品性状試験マウス
体重グラム (g)
グルーブ平均データー

マウス No.	物質 性	経与開始後の各日の体重 (g)														
		0	4	7	11	14	18	21	25	29	33	37	40	43	47	
201	スズラン	0	24	24	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
202	スズラン	0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
203	スズラン	0	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
204	スズラン	0	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
205	スズラン	0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
206	スズラン	0	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
207	スズラン	0	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
208	スズラン	0	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
209	スズラン	0	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
210	スズラン	0	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24

100.00

特表平5-504761(19)

FIG. 41 (その2)

FIG. 41 (その1)

膜翅類毒素。長期毒性試驗 - マウス。
顯微鏡觀察

FIG. 41(403)

FIG. 41A

FIG. 41(403)

臨期細菌素。長期毒性試驗 - マウス。

Fig. 41. の解説

1. リンパ球細胞の病巣的な小さい堆積化。
2. おそらく気管支上皮に由来する小さな腫瘍。
3. 気管支上皮の小さな結節過形成。
4. 多核性顆粒球の浸潤を伴った小さく、古めかしい、そして見分けのつけられない壊死。
5. 多量の多形核の浸潤を有する病巣的な古めかしい壊死。
6. 多核性顆粒球の浸潤を伴う広範囲且つ不明瞭な壊死。
7. 中程度のリンパ系過形成。
8. わずかな細胞浸潤を有する数個の肝細胞の壊死。
9. 織維組織により若干仕切られ、そして多形核及びマクロファージが多量に浸潤されている、病巣的壊死。
10. 若干の慢性腎盂腎炎。
11. 腸壁への慢性織維性付着。
12. 腎臓への慢性織維性付着及びよく血管化された付着。

組織学的に正常な穿刺を有する腸管を0で示した。正常からかけ離れている場合、次項においてそれを説明する。「-」で示した腸管は組織学的に検査していない。

FIG. 42

利用したメリチン類似体及びその他のペプチド

1. Mellitin:

Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Gln-Gln-Amide.

2. Mellitin acid:

Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Gln-Gln-Amide.

3. Mellitin 6:

Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Lys-Gly-Gln-Gln-Amide.

4. Mellitin 4:

Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Gly-Gly-Gly-Amide.

5. Mellitin R:

Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Amide.

6. Mellitin Y:

Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Ile-Ser-Trp-Ile-Orn-Orn-Amide.

7. Mellitin 1-26:

Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Ile-Ser-Trp-Ile-Amide.

8. Amfi 1:

Sequence: Gly-Thr-Asp-Arg-Val-Ile-Glu-Val-Gln-Gly-Ala-Cys-Ary-Ala-Ile-Arg-His-Ile-Pro-Arg-Arg-Ile-Arg-Gln-Gly-Amide.

9. Amfi 2:

Sequence: Gly-Gln-Arg-Val-Arg-Asn-Val-Ile-Ser-Leu-Val-Ala-Phe-Val-Ile-Arg-Leu-Gly-Val-Leu-Gly-Gly-Val-Ile-Met-Ile-Phe-Amide.

10. MNG:

Sequence: Val-Ala-Ala-Lys-Ala-Asn-Arg-Val-Ala-Asp-Glu-Ile-Arg-His-Lys-Arg-Glu-Lys-Leu-Glu-Amide.

11. Holst:

Sequence: Phe-Ala-Glu-Ser-Gly-Val-Asp-Thr-Pro-Val-Phe-Asn-Ser-Tyr-Amide.

哺乳類のHIV感染細胞の増殖又は感染細胞におけるウイルスの複製を阻害する、哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与することを含む哺乳類HIV感染症の治療のための方法及び組成物について開示する。

補正書の翻訳文提出書

(特許法第184条の8)

平成4年6月5日

特許庁長官 深沢 直樹

1 特許出願の表示

PCT/EP90/02127

2 発明の名称

哺乳類のHIV感染症の治療のための方法及び組成物

3 特許出願人

住所 ドイツ連邦共和国, デー-8042 ノイヘルベルク,
インゴルシュテットター ラントシュトラーセ 1

名称 ゲーネスエフーフォルシュンクスツェントルム
フュア ウムベルト ウント ゲズントハイト,
ゲゼルシャフト ミット ベシュレンケル
ハフツング

4 代理人

住所 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号静光虎ノ門ビル
〒105 電話 (3504)0721

氏名 斎程士(6579)青木 利

(外3名)

5 補正書の提出年月日

1992年2月10日

6添付書類の目録

補正書の翻訳文

明細書

更に、この発明者は、メリチン類似体であって、少なくともその最後の6個のアミノ酸(C-末端)が変異して6個のグリシン残基に置き代わられているものの直接的な作用が、メリチンに類似する治療的利点を有すことを発見している。このアミノ酸類似体は、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly の構造を有す。

Merck Index (1983) 第10版、5643号にメリチンが抗リウマチ剤として利用できることが更に知られる。

米国特許出願第3,856,936号は、ココアバター脂肪酸との混合体における、有効量の全ハチ毒素及びメリチンより成る群から選ばれるものより成る、局所的利用による哺乳類におけるコルチゾールレベルコントロールのための組成物を開示している。

従って、膜透性毒素又はそのタシパク質性もしくはホリベブチ成分、あるいはメリチンの複数の医療用途が既に知られている。しかしながら、HIV感染症の治療のための医薬品の製造におけるメリチン又は膜透性毒素の利用に関して述べている既知論文はない。

請求の範囲

1. 哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製を低める又は阻害せしめる哺乳類におけるHIV感染症の治療のための医薬の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの利用。

2. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体の利用。

3. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物の利用。

4. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、少なくとも1種類の膜細胞毒素、少なくとも1種類の膜細胞毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜細胞毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤の利用。

5. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、ハチミツ毒素、マルハナ毒素、スズメバチ毒素、ポールドフェースオオクマバチ毒素、該毒素の活性タンパク質成分、該毒素の活性タンパク質成分、及びそれらの混合物より実質的に成る群から選ばれる薬剤の利用。

6. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親媒性 α -ヘリックスの利用。

7. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効

投与量のGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly の利用。

8. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly の構造類似体の利用。

9. 哺乳類におけるHIV感染細胞の増殖を低める又は阻害せしめる哺乳類におけるHIV感染症の治療のための医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの利用。

10. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体の利用。

11. 請求項9に記載の医薬品の製造における、Amf1 1 及びメリチン様であるGP41のペプチドの利用。

12. 請求項9に記載の医薬品の製造における、Amf1 2 及びメリチン様であるGP41のペプチドの利用。

13. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物の利用。

14. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、少なくとも1種類の膜細胞毒素、少なくとも1種類の膜細胞毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜細胞毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤の利用。

15. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有

効投与量の、ハチミツ毒素、マルハナ毒素、スズメバチ毒素、ポールドフェースオオクマバチ毒素、該毒素の活性タンパク質成分、該毒素の活性タンパク質成分、及びそれらの混合物より実質的に成る群から選ばれる薬剤の利用。

16. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親媒性 α -ヘリックスの利用。

17. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly の利用。

18. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly の構造類似体の利用。

19. 哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製を低める又は阻害せしめる哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための医薬の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの利用。

20. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体の利用。

21. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物の利用。

22. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性

有効投与量の、少なくとも1種類の膜細胞毒素、少なくとも1種類の膜細胞毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜細胞毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤の利用。

23. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、ハチミツ毒素、マルハナ毒素、スズメバチ毒素、ポールドフェースオオクマバチ毒素、該毒素の活性タンパク質成分、該毒素の活性タンパク質成分、及びそれらの混合物より実質的に成る群から選ばれる薬剤の利用。

24. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親媒性 α -ヘリックスの利用。

25. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly の利用。

26. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly の構造類似体の利用。

27. 哺乳類におけるレトロウイルス感染細胞の増殖を低める又は阻害せしめる哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための医薬の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの利用。

28. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性

特表平5-504761 (22)

有効投与量のメリチンの構造類似体の利用。

29. 請求項27に記載の医薬品の製造における、Amf 11及びメリチン様であるGP41のペプチドの利用。

30. 請求項27に記載の医薬品の製造における、Amf 12及びメリチン様であるGP41のペプチドの利用。

31. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物の利用。

32. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、少なくとも1種類の膜透類毒素、少なくとも1種類の膜透類毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜透類毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤の利用。

33. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、ハチミツ毒素、マルハナ毒素、スズメバチ毒素、ボールドフェースオオクマバチ毒素、蜂毒素の活性タンパク質成分、蜂毒素の活性タンパク質成分、及びそれらの混合物より実質的に成る群から選ばれる薬剤の利用。

34. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない同様性々ヘリックスの利用。

35. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly の利用。

36. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びGly-Ile-Gly-Ala-Val-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly の構造類似体の利用。

国際検査報告	
International Application No. PCT/EP 90/02127	
Classification of SUBJECT MATTER in several classification systems, indicate with "X"	
According to International Patent Classification (IPC) or its later National Correspondence and CPC	
Int. Cl. 5 A 61 K 37/02	
2. FIELDS SEARCHED	
Maximum Documentation Retrieved * Classification Systems	
Classification System	
Int. Cl. 5	A 61 K
Documentation Supplied other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Recorded in the Patent Database	
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*	
Category 1: Citations of Objections, "Non-Inventive, Minor, or other than Obviousness" or References to Objection No. 1*	
A	US-A- 3856936 (J.A. VICK et al.) 24 December 1974
* General categories of cited documents: ① Non-Inventive, minor, or other than Obviousness ② Document relating to general state of the art which is not considered to be of particular relevance ③ Document which is not published until after the international filing date ④ Document which is not published until after the international filing date and which may affect the patentability of the claimed invention ⑤ Document which may affect the patentability of the claimed invention by anticipation or other reason related to the claimed invention ⑥ Document relating to a prior application, which is published or otherwise made available to the public before the international filing date but which may affect the patentability of the claimed invention ⑦ Document which is published or otherwise made available to the public after the international filing date but which may affect the patentability of the claimed invention	
IV. CERTIFICATION	
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Filing of the International Search Report
13 March 1991 (13.03.91)	22 April 1991 (22.04.91)
International Examining Authority	Examiner of International Search
European Patent Office	

Patent document cited in search report	Priorities date	Patent family number(s)	Publishing date
US-A- 3856936	24-12-74	None	

* For more details about this entry, see Official Journal of the European Patent Office, No. 13/23

第1頁の続き

②発明者 サエルマルク, トルベン

スウェーデン國, エス-211 30 マルモエー, グスタフ アドル
フス トルク 43